埃及伊蚊对登革Ⅱ型病毒感染 Balb/C 实验小鼠的增强

朱礼华，赵彤言*，董言德，陆宝麟
（军事医学科学院微生物流行病研究所全军媒介生物学重点实验室，北京　100071）

摘要：以 Balb/C 小鼠为实验动物，探讨了埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 唾液对登革病毒感染宿主的影响。结果显示，在皮下接种剂量相同的情况下，如果 Balb/C 实验小鼠预先被一定数量的埃及伊蚊叮咬以后，实验小鼠感染病毒的程度有所提高，血清中的抗体滴度明显降低，腹腔巨噬细胞感染登革病毒的阳性率及感染的时间动态曲线也有明显差异，感染高峰期延迟。这些说明实验小鼠被媒介蚊虫叮咬以后变得相对容易被登革病毒感染，可能是媒介蚊虫叮咬小鼠时分泌的唾液对宿主的免疫反应系统有一定作用。因此可以初步肯定埃及伊蚊在登革病毒的感染传播过程中，影响了 Balb/C 实验小鼠的免疫功能，对登革病毒的感染有一定推动作用。

关键词：埃及伊蚊；唾液；登革病毒；Balb/C 小鼠；感染；增强
中图分类号：R384.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）05-0588-05

Mosquito-induced enhancement of Dengue virus infection in mice

ZHU Li-Hua，ZHAO Tong-Yan*，DONG Yan-De，LU Bao-Lin（Department of Vector Biology and Control，Institute of Microbiology and Epidemiology，Academy of Military Medical Sciences，Beijing　100071，China）

Abstract: Dengue fever（DF）/dengue haemorrhagic fever（DHF）is one of the most important human arbo-virus infectious diseases in tropical and subtropical areas with increasing numbers of patients and the expansion of epidemic areas. Understanding the mechanisms of its infection and spread is the foundation for effective surveillance and control of this disease and its mosquito vector. The saliva secreted by feeding mosquitoes is not only the liquid vector of virus transmission，but can also enhance virus infection through immuno-modulation of its vertebrate host. This paper reports experiments that sought to determine if the DEN-2 virus infection in Balb/C laboratory mice could be enhanced by the vector mosquito *Aedes aegypti*. After being bitten by a number of mosquitoes，mice were injected intravenously with defined titers of the DEN-2 virus. The differences in viremia，the titers of DEN-2 antibodies and the infection rates of macrophages in the abdominal cavities of these mice were observed and compared with those of mice that had only been injected with the DEN-2 virus. The results showed mice that had been bitten by vector mosquitoes were more easier infected with the DEN-2 virus; periods of viremia were extended from 1－2 days to 4 days，antibody titres dropped from 1∶64，1∶96 to 1∶16 and 1∶32 respectively in the 4th and 7th days after injection while infection rates of macrophages varied over the first 7 days. These results indicate that vector mosquito bites can enhance the infection of mice with the DEN-2 virus.

Key words: *Aedes aegypti*; siliva; DEN-2 virus; Balb/C mice; infection; enhancement

媒介蚊虫叮咬宿主吸血时分泌的唾液不仅是病毒传播的液体环境，还可能通过影响宿主的免疫作用，对蚊媒病毒感染宿主有一定推动作用。近几年的研究发现了媒介蚊虫的这种推动作用，对 Cache valley 病毒感染传播研究发现只有通过蚊虫有效的叮咬 Balb/C 实验小鼠才能产生病毒血症和相应的抗体，而仅皮下注射病毒则不能（Edwards *et al*.，1998）；用感染 LAC 病毒的蚊虫叮咬比皮下注射同样剂量的病毒能使动物宿主产生更高的病毒血症（Osorio *et al*.，1996）。研究还发现埃及伊蚊 *Aedes*

基金项目：总后“九五”杰出青年基金项目资助
第一作者简介：朱礼华，男，1971 年 10 月生，博士，助理研究员，研究方向为媒介生物学及防治，E-mail：lhzhu@nic.bmi.ac.cn
＊联系作者 Author for correspondence
收稿日期 Received：2001-11-12；接受日期 Accepted：2002-06-19

aegypti 唾液腺裂解液能抑制或调节动物宿主免疫反应，能抑制大白鼠离体肥大细胞分泌肿瘤坏死因子 TNF-α（Bissonnette *et al*.，1992），TNF-α 在动物体内既是免疫调节因子，又是效应因子，在免疫应答过程中有不可缺少的作用；能抑制 Balb/C 小鼠离体 T 细胞的增殖及其细胞因子 IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-5 的分泌（Cross *et al*.，1994），这些因子在宿主体内是重要的免疫调节因子。媒介昆虫对病原体感染传播的推动作用在其他虫媒病研究中也发现，白蛉 *Lutzomyia longipalpis* 唾液的裂解液能使实验小鼠对利什曼原虫 *Leishmania major* 的感染剂量大幅度降低，有助于利什曼原虫在宿主体内的增殖（Titus and Ribeiro，1988）。本研究以登革病毒感染 Balb/C 小鼠作为研究靶标建立这类实验的动物模型，并探讨媒介蚊虫埃及伊蚊唾液对登革病毒感染宿主是否具有一定的推动作用，如实验小鼠能否感染登革病毒、产生病毒血症和相应抗体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

埃及伊蚊：实验室常规饲养，温度 25 ± 1℃，相对湿度 80% ± 5%，光照 14 h。登革Ⅱ型病毒（DEN-2）：新几内亚 B 株，乳鼠脑传代，液氮冻存备用。C6/36 细胞：28℃，5% CO_2 培养条件下，DMEM（含 10%胎牛血清）传代培养。实验小鼠：Balb/C，雌性，5～6 周龄，购于军事医学科学院实验动物中心。羊抗兔（鼠）FITC 荧光标记二抗，北京中山生物技术公司。

1.2 DEN-2 病毒感染 Balb/C 实验小鼠

用一次性 PE 手套包住小鼠，在其腹部剪一 2 cm × 2 cm 的空缺以让蚊虫叮咬，目测计数，每只被叮咬 50 次。叮咬后马上接种 2% DEN-2 鼠脑病毒，采取腹部皮下多点注射接种，分 5～6 位点，每只注射量为 0.1 mL 2% DEN-2 鼠脑病毒悬液，病毒效价 $10^{7.07\sim8.3}$ TCID50，然后按组分笼喂养。分别在小鼠感染 DEN-2 病毒后 1、2、3、4、5、6、7、14、21、28 天，眼球取血，分离血清用于检测病毒或抗体滴度，拉颈处死，新洁尔灭浸泡消毒，常规免疫学方法分离小鼠腹腔巨噬细胞，洗涤 2 次，涂片后丙酮固定，－20℃保存备用。

1.3 RT-PCR 检测血清 DEN-2 病毒 RNA

上游引物 P1：5′- CTG ATT TCC AT（A，C，G，T）CC（A，G）TG-3′，下游引物 P2：5′-AAG CTT GAG ATG GAC TTT-3′。血清病毒 RNA 提取：200 μL 小鼠血清加 1 mL Trizol 裂解液（Gibco 公司产品），氯仿抽提，异丙醇沉淀，沉淀溶于 20 μL 双蒸水（ddH_2O）。立即进行 RT 反应。PCR 循环条件：95℃预变性 5 min、94℃变性 1 min、55℃复性 45 s、72℃延伸 1 min，30 个循环，72℃延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳观察、拍照。

1.4 小鼠血清 DEN-2 病毒中和抗体检测

间接免疫荧光染色，小鼠血清按比例稀释成 4 个实验浓度梯度，C6/36 DEN-2 病毒作为抗原，以正常 C6/36 细胞涂片、正常小鼠血清为阴性对照，每步均设空白对照，3 次重复，计算抗体效价。

1.5 小鼠腹腔巨噬细胞病毒检测

间接免疫荧光染色：10% 山羊血清封闭，以兔抗 C6/36 DEN-2 病毒抗体为一抗，FITC 标记羊抗兔抗体为二抗，荧光显微镜下观察，选择视野较清楚区域计数，数 200 个细胞，重复 3 次，统计阳性率。以正常未接种小鼠细胞涂片为阴性对照，每步均设空白对照，3 次重复。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 Balb/C 小鼠血清病毒 RNA 结果

接种后 5 天内的小鼠血清用 RT-PCR 检测了血清中的病毒 RNA（图 1），每组数据检测 3 只小鼠，结果发现对照接种一般 1～2 天内可检测到阳性，接种后第 1 天 3 只有 2 只阳性（2/3），第 2 天 1 只阳性（1/3），埃及伊蚊叮咬以后到第 4 天可检测到阳性（2/3）（表 1），说明腹部皮下接种能使 Balb/C 小鼠产生 1～2 天的病毒血症，蚊虫叮咬可使病毒血症维持时间延长，可能是有助于病毒在体内存活，不被免疫细胞吞噬。

2.2 对 DEN-2 感染 Balb/C 小鼠以后血清中和抗体产生的影响

分别测定了接种后 4、7、14、21、28 天的 Balb/C 小鼠血清中 DEN-2 特异性抗体滴度，结果见表 2。埃及伊蚊叮咬组 4～14 天内均比对照接种组要低，第 4、7 天差异明显（$P < 0.01$），而 21、28 天抗体滴度与对照接种组没有太大区别，说明媒介蚊虫埃及伊蚊叮咬以后使 Balb/C 小鼠血清抗体产生延迟，持续时间相对较长，但抗体滴度总体较低。

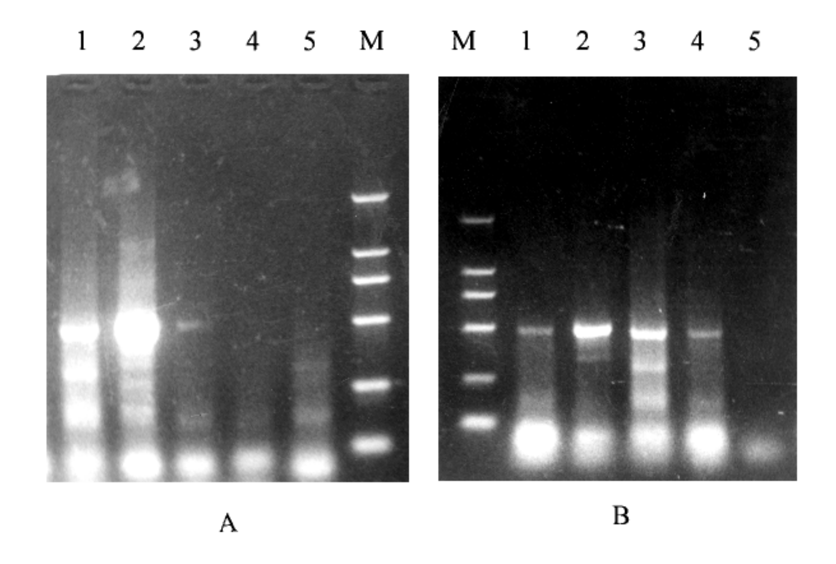


图1 RT-PCR检测Balb/C小鼠血清中的DEN-2病毒RNA

Fig. 1 DEN-2 virus RNA in sera of Balb/C mice detected with RT-PCR

A：对照接种组（control）；B：埃及伊蚊组（*Ae. aegypti* group）；M：标准分子量（DNA markers）；

1～5：感染后1～5天（1－5 days after infection）

表1 RT-PCR检测Balb/C小鼠血清中的DEN-2病毒RNA（阳性数/实验数）

Table 1 Den-2 virus RNA in sera detected with RT-PCR（positive/total tests）

分组 Group	感染后天数（天）Days after infection				
	1	2	3	4	5
对照接种组 control	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
埃及伊蚊组 *Ae. Aegypti* group	3/3	3/3	2/3	2/3	0/3

表2 DEN-2病毒感染宿主以后血清中和抗体的时间动态

Table 2 DEN-2 antibody titers in sera after infection

分组 Group	感染后天数（天）Days after infection				
	4	7	14	21	28
埃及伊蚊组 *Ae. aegypti* group	1:16*	1:20*	1:48	1:32	1:16
对照接种组 control	1:48	1:96	1:80	1:32	1:8

* 经统计学检验，与对照接种组有显著性差异（$P<0.01$）

Data with asterisk are significantly different by statistic test（$P<0.01$）

2.3 对Balb/C小鼠腹腔巨噬细胞DEN-2阳性感染率的影响

用免疫荧光的方法对小鼠腹腔巨噬细胞中登革病毒进行检测，在荧光显微镜下观察计数，发黄绿色荧光的是阳性感染的细胞（图2）。统计结果见表3，与对照接种组相比，在感染后前3天感染率有差异（$P<0.01$），第1天感染率相对低，第2天感染率上升，比对照接种组高，第3天以后下降，3～14天均相对比对照接种组要高，显示腹腔巨噬细胞DEN-2感染有差异；对照接种第1天是高峰，以后下降；而埃及伊蚊叮咬组在感染后第2天是高峰，比对照接种组延迟，说明埃及伊蚊叮咬对腹腔巨噬细胞的感染DEN-2有一定影响，尤其在DEN-2感染初期。

3 讨论

媒介昆虫对虫媒病感染传播增强的研究可以从两个方面来探讨，或能降低虫媒病毒敏感动物的感染剂量或增强感染致病能力，或在一定的条件下能促使非敏感动物感染。目前已在两种蚊媒病毒La Cross病毒、Cache valley病毒的研究中发现类似感染增强的结果（Edwards *et al.*，1998；Osorio *et al.*，1996），在登革病毒方面类似的研究以前未见有报道。我们的研究发现，媒介蚊虫埃及伊蚊叮咬以后能使DEN-2病毒感染Balb/C实验小鼠产生的病毒血症由1～2天延长到3～4天，同时抗体产生延缓且水平降低，这说明蚊虫叮咬对登革病毒感染宿主有一定的促进作用，但具体机制还有待进一步探讨。

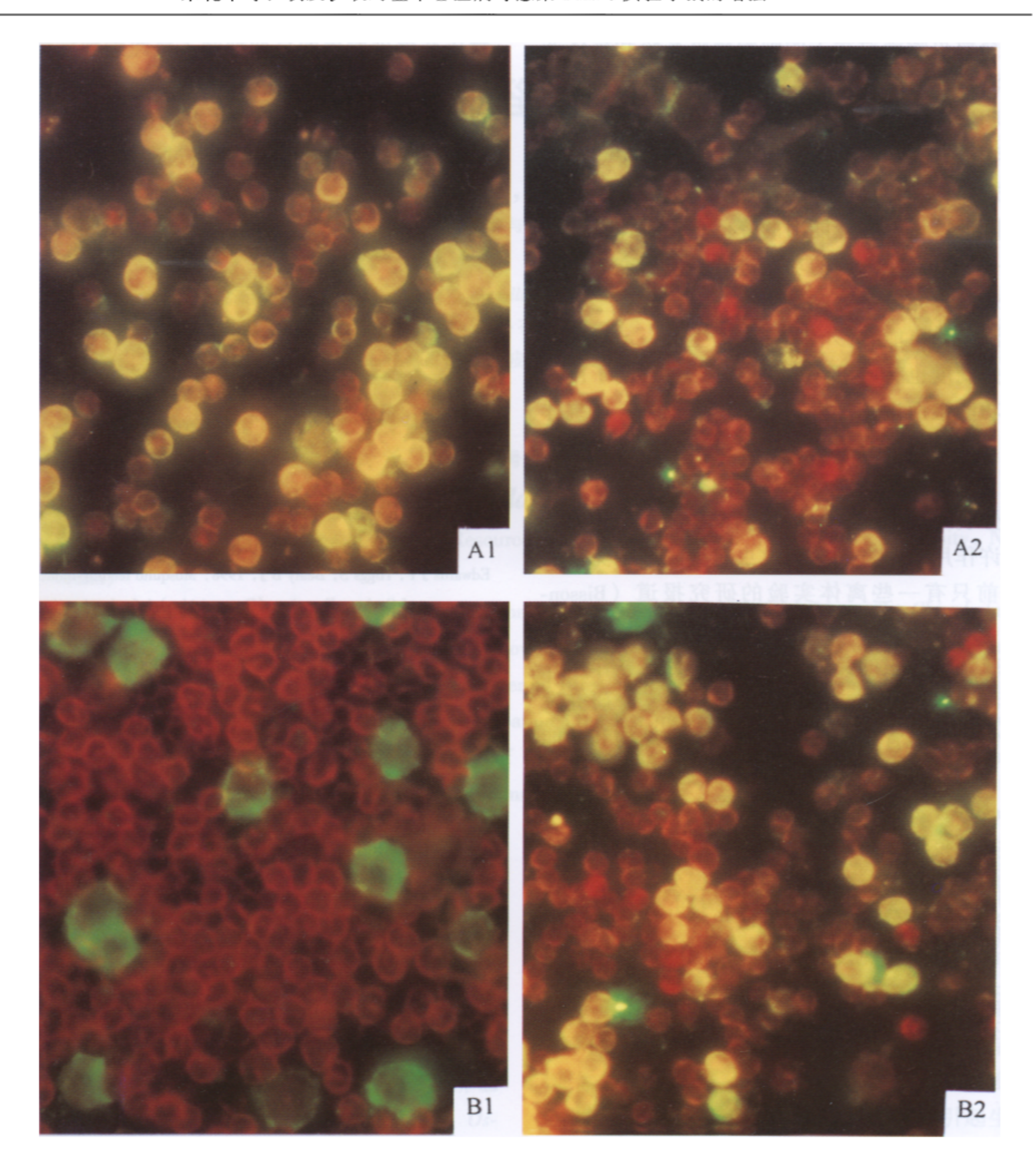


图 2 Balb/C 小鼠腹腔巨噬细胞免疫荧光照片（400×）

Fig. 2 DEN-2 virus in macrophages of Balb/C mice detected with IFA（400×）

A：对照接种组（control）；B：埃及伊蚊组（*Ae. aegypti* group）；1～2：感染后第 1～2 天（1～2 days after infection）

表 3 DEN-2 感染 Balb/C 小鼠以后腹腔巨噬细胞的阳性感染率（%）

Table 3 Den-2 virus infection in macrophages after infection（%）

分组 Group	感染后天数（天）Days after infection						
	1	2	3	4	5	7	14
对照接种组 control	64.5±7.2	28.3±5.0	12.5±4.2	8.3±2.7	5.5±1.5	4.2±1.0	4.7±1.0
埃及伊蚊组 *Ae. aegypti* group	28.8±5.2*	50.5±3.2*	25.2±5.8*	15.2±5.5	10.5±4.2	7.8±2.5	7.3±1.3

* 经统计学检验，与对照接种组有显著性差异（$P<0.01$）

Data with asterisk are significantly different by statistics test（$P<0.01$）

媒介蚊虫唾液对宿主的细胞免疫系统和抗体产生的体液免疫系统均可能有影响，病毒血症时间延长，说明影响了非特异性免疫细胞的吞噬作用，对登革病毒的杀灭作用减弱，腹腔巨噬细胞中登革病毒感染规律的变化说明了这一点，感染后第 1 天的感染率降低，说明吞噬能力的降低，但具体情况还需要进一步对巨噬细胞的功能进行相应研究。同时研究还表明媒介蚊虫叮咬对登革病毒抗体产生过程及抗体滴度均可能有影响，抗体产生有一定延缓趋势，抗体滴度也有所下降，可能是通过影响了巨噬细胞的功能继而进一步影响了登革病毒特异性抗体的产生，如果能进一步在宿主免疫机理方面深入研究，如 T 细胞亚群方面、巨噬细胞吞噬功能方面等做一些分析可能对这一问题会有一个更清楚的认识，也许作用是多方面的。蚊虫对宿主细胞免疫的影响目前只有一些离体实验的研究报道（Bissonnette *et al*.，1992；Cross *et al*.，1994），说明能有效抑制或调节宿主的免疫应答反应，但这些作用在登革病毒感染过程中起何种效应还不清楚。研究发现埃及伊蚊舒血管物唾液腺激肽是一种结构和功能与哺乳动物体内的 P 物质类似的速激肽类物质（Champagne *et al*.，1994），P 物质是哺乳动物体内神经肽类免疫调节物质，具有多种生理效应，如促进 T 细胞的增殖、巨噬细胞的代谢爆发杀菌能力增强及炎症分子的分泌等，也可使免疫球蛋白的合成增加，诱导特异性免疫反应，唾液腺激肽可能也具有一些类似的免疫调节作用，虽然未见有研究报道来证实在白蛉传播黑热病的研究发现长须白蛉唾液物质在感染发生的早期抑制了巨噬细胞抗原递呈细胞的功能（Theodos *et al*.，1991；Theodos and Titus，1993），减少对利什曼原虫的杀伤免疫，也许这种机制在蚊媒病毒的感染传播过程中可能有类似之处。

参 考 文 献 （References）

Bissonnette E Y，Rossignol P A，Befus A D，1992. Extract of mosquito salivary glands inhibit tumor necrosis factor alpha release from mast cells. *Parasite Immum*.，14：27－33.

Champagne D E，Ribeiro J M C，1994. Sialokinin Ⅰ and Ⅱ：vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.，91：138－142.

Cross M L，Cupp E W，Enriquiz F J，1994. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.，51（5）：690－696.

Edwards J F，Higgs S，Beaty B J，1998. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache valley virus（Bunyaviridae）infection in mice. *J. Med. Entomol*.，35（3）：261－265.

Osorio J E，Godsey M S，Defoliart G R，Yuill T M，1996. LaCrosse viremias in white-tailed deer and chipmunks exposed by injection or mosquito bite. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.，54：338－342.

Theodos C M，Titus R G，1993. Salivary gland material from the sand fly has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. *Parasite Immun*.，15：481－487.

Theodos C M，Ribeiro J M C，Titus R G，1991. Analysis of the enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and Immunity*，59：1 592－1 598.

Titus R G，Ribeiro J M C，1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*，239：1 306－1 308.